

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire:

DUBRUC, Philippe
Rhodia Services
Direction de la Propriété
Industrielle
40, rue de la Haie-Coq
F-93306 Aubervilliers Cedex
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 29 octobre 2001 (29.10.01)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire R 99110	
Demande internationale no PCT/FR00/02452	Date du dépôt international (jour/mois/année) 06 septembre 2000 (06.09.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant ☐ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse RHODIA CHIMIE 25, quai Paul Doumer F-92408 Courbevoie Cedex FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone 33 1 47 68 20 20	
	no de télécopieur 33 1 47 68 16 56	
	no de téléimprimeur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☐ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse RHODIA CHIMIE 26, quai Alphonse Le Gallo F-92512 Boulogne-Billancourt Cedex FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés
☒ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé: Sean Taylor
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

DUBRUC, Philippe
Rhodia Services
Direction de la Propriété
Industrielle
40, rue de la Haie-Coq
F-93306 Aubervilliers Cedex
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 29 octobre 2001 (29.10.01)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire R 99110	
Demande internationale no PCT/FR00/02452	Date du dépôt international (jour/mois/année) 06 septembre 2000 (06.09.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant ☐ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse RHODIA CHIMIE 25, quai Paul Doumer F-92408 Courbevoie Cedex FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone 33 1 47 68 20 20	
	no de télécopieur 33 1 47 68 16 56	
	no de téléimprimeur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☐ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse RHODIA CHIMIE 26, quai Alphonse Le Gallo F-92512 Boulogne-Billancourt Cedex FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés
☒ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Sean Taylor no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 29 octobre 2001 (29.10.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/02452	Référence du dossier du déposant ou du mandataire R 99110
Date du dépôt international (jour/mois/année) 06 septembre 2000 (06.09.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 07 septembre 1999 (07.09.99)
Déposant NORE, Olivier etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

06 avril 2001 (06.04.01)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

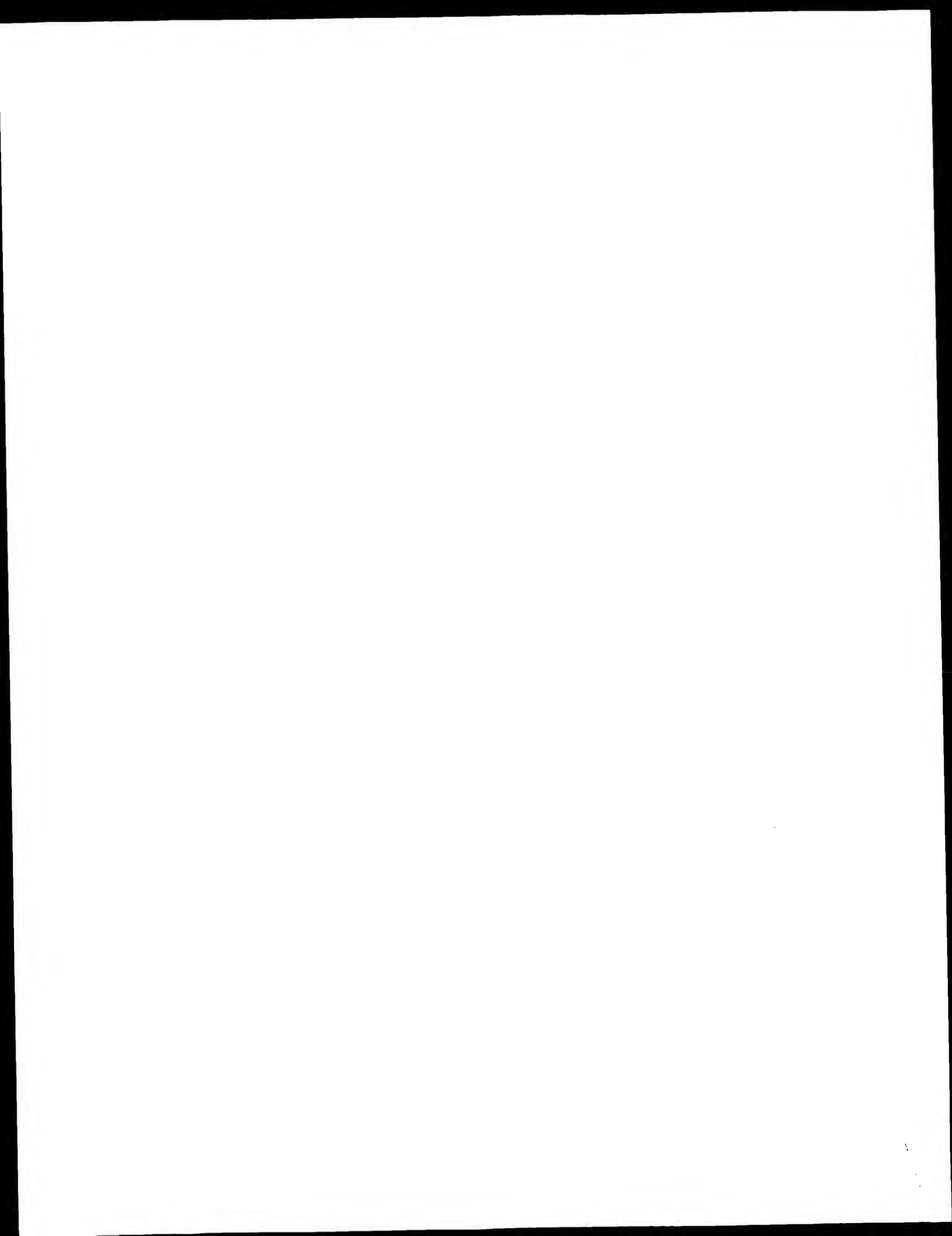
Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé

Sean Taylor

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

no de téléphone: (41-22) 338.83.38



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

6

Applicant's or agent's file reference R 99110		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/02452	International filing date (day/month/year) 06 September 2000 (06.09.00)	Priority date (day/month/year) 07 September 1999 (07.09.99)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P 19/04			
Applicant RHODIA CHIMIE			

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
 These annexes consist of a total of _____ sheets.
- This report contains indications relating to the following items:
 - I ☒ Basis of the report
 - II ☐ Priority
 - III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - IV ☐ Lack of unity of invention
 - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - VI ☐ Certain documents cited
 - VII ☒ Certain defects in the international application
 - VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 06 April 2001 (06.04.01)	Date of completion of this report 02 November 2001 (02.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02452

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

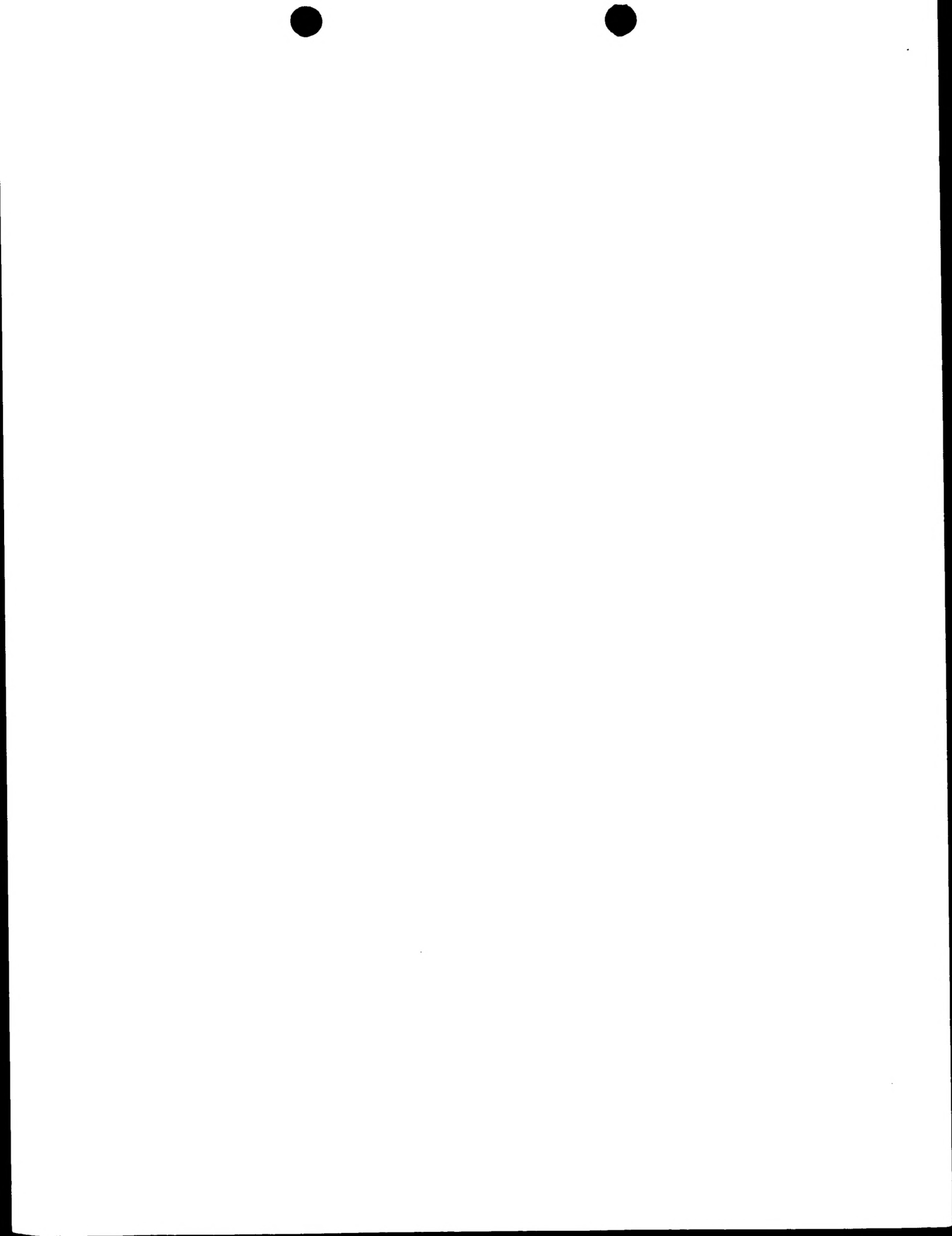
- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-13, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-16, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: Roukas Triantafyllos et al.: "Evaluation of carob pod as a substrate for Pullulan production by Aureobasidium pullulans"; APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, Vol. 55, no. 1, 1995, pages 27-44, XP000915013,

D2: Roseiro J C et al.: "Batch and fed-batch cultivation of Xanthomonas campresis in carob extracts"; LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT & TECHNOLOGIE, Vol. 25, no. 3, 1992, pages 289-293, XP000922972.

None of the available prior art documents describes the method for producing exopolysaccharides according to Claims 1 to 15 or the resulting exopolysaccharide according to Claim 16, characterized particularly by the fermentation of microorganisms ~~in~~ a nutrient medium derived from a fraction of **carob seed** (rich in proteins and sugars).

It is known that the carob pod is comprised of two parts, the kibble and the seed (see, for example, D1, page 28, line 5).

D1 describes the method for producing pullulan by fermenting *Aureobasidium pullulans* in a nutrient medium derived from a carob extract rich in sugars. This extract is obtained from the carob pod, from which the seed is removed and the kibble is then processed in order to extract the sugars (= carob extract) (see D1, page 29, second paragraph, "Preparation of fermentation medium"). Therefore, the nutrient medium used in D1 **does not include carob seed**; it is merely derived from the kibble, which is low in proteins and rich in sugars (see the composition mentioned on page 28, lines 8-11).

D2 describes the method for producing xanthan by fermenting *Xanthomonas campresis* in a nutrient medium derived from a carob extract rich in sugars (= "carob extract" or "carob syrup"; see, particularly, page 290, right-hand column, lines 8-12). As in D1, this carob extract is obtained from the kibble of the carob pod ("in the form of kibbles"; cf. page 289, right-hand column, last paragraph). Therefore, the nutrient medium used in D2 **does not include carob seed**.

The method of the present application is therefore novel. Moreover, this method leads to exopolysaccharides that have a luminescence and a brightness never observed in any other nutrient medium (see page 13, last sentence of the present application). The exopolysaccharides achieved as claimed in Claim 16 are therefore novel. Furthermore, they meet the organoleptic, sensory and visual requirements sought in the ~~food~~ or cosmetic industry, in which said exopolysaccharides are used. Therefore, the subject matter of **Claims 1 to 16** appears to meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the relevant prior art disclosed in documents **D1** and **D2** has not been indicated in the description, nor have these documents been cited.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The embodiments of the invention described on page 6, lines 32-34 are not covered by the claims. This lack of consistency between the claims and the description appears to indicate that the subject matter for which protection is sought is different from that defined in the claims. A lack of clarity results (PCT Article 6) when the claims are interpreted in light of the description. The applicant is asked to delete this inconsistency.

PCT

REC'D 07 NOV 2001

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL



(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire R 99110	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02452	Date du dépôt international (jour/mois/année) 06/09/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 07/09/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12P19/04		
Déposant RHODIA CHIMIE		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
- ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).
- Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 06/04/2001	Date d'achèvement du présent rapport 02.11.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Gohlke, P N° de téléphone +49 89 2399 8549 



**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02452

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-13 version initiale

Revendications, N°:

1-16 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02452

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée



Il est fait référence aux documents suivants:

D1 = Roukas Triantafyllos et al.: "Evaluation of carob pod as a substrate for Pullulan production by Aureobasidium pullulans"; APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 55, no. 1, 1995, pages 27- 44, XP000915013.

D2 = Roseiro J C et al.: "Batch and fed-batch cultivation of Xanthomonas campresis in carob extracts"; LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT & TECHNOLOGIE, vol. 25, no. 3, 1992, pages 289-293, XP000922972.

Section V:

Aucun art antérieur disponible décrit le procédé de production d'exopolysaccharides selon les revendications 1 à 15 et l'exopolysaccharide ainsi obtenu selon la revendication 16, caractérisé notamment par fermentation de microorganismes dans un milieu nutritif dérivant d'une fraction de la **graine de caroube** (riches en protéines et sucres).

Il est connu que le fruit du caroubier (carob pod) est constitué de deux parties, la cosse (kibble) et la graine (seed) (voir par exemple D1, page 28, ligne 5).

D1 décrit le procédé de production de pullulane par fermentation de Aureobasidium pullulans dans un milieu nutritif dérivant d'un extrait de caroube riche en sucres. Cet extrait est obtenu à partir du fruit du caroubier, duquel on retire la graine et la cosse est ensuite traitée pour en extraire les sucres = extrait de caroube (voir D1 page 29, deuxième paragraphe "Preparation of fermentation medium"). Ainsi le milieu nutritif utilisé dans D1 **ne comprend pas la graine** de caroube, il est seulement constitué à partir de la cosse pauvre en protéines et riche en sucres (voir composition mentionnée page 28, lignes 8-11).

D2 décrit le procédé de production de xanthane par fermentation de Xanthomonas campresis dans un milieu nutritif dérivant d'un extrait de caroube riche en sucres (= "carob extract" ou "carob syrup"; voir notamment page 290, col. de droite, lignes 8-12). Cet extrait de caroube est, comme dans D1, obtenu à partir de la cosse du fruit de caroube ("in the form of kibbles"; cf. page 289, col. de droite, dernier paragraphe). Ainsi le milieu nutritif utilisé dans D2 **ne comprend pas la graine** de caroube.

Le procédé de la présente demande est donc nouveau. D'autre part ce procédé permet



l'obtention d'exopolysaccharides présentant une luminosité et une brillance jamais observées avec n'importe quel autre milieu nutritif (voir page 13, dernière phrase de la présente demande); les exopolysaccharides ainsi obtenus tels que revendiqués dans la revendication 16 sont donc aussi nouveaux. D'autre part, ils satisfont aux exigences organoptiques, sensorielles et visuelles recherchées dans l'industrie alimentaire ou cosmétique dans lesquelles ils sont utilisés.

Ainsi l'objet des **revendications 1 à 16** semble répondre aux conditions des articles 33(2) et (3) du PCT.

Section VII:

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents **D1** et **D2** et ne cite pas ces documents.

Section VIII:

Les modes de réalisation de l'invention décrits à la page 6, lignes 32-34 ne sont pas couverts par les revendications. Ce défaut de concordance entre les revendications et la description semble indiquer que l'objet de la protection est différent de celui qui a été défini dans les revendications. Il en résulte un manque de clarté (article 6 PCT) lorsque les revendications sont interprétées à la lumière de la description. Le demandeur est prié de supprimer cette discordance.



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire R 99110	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 02452	Date du dépôt international (jour/mois/année) 06/09/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 07/09/1999
Déposant RHODIA CHEMIE		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.



5

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12P19/04 C12P19/06 C12N1/14 C12N1/20 C08B37/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12P C12N C08B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

FSTA, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ROUKAS TRIANTAFYLLOS ET AL: "Evaluation of carob pod as a substrate for pullulan production by Aureobasidium pullulans." APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 55, no. 1, octobre 1995 (1995-10), pages 27-44, XP000915013 ISSN: 0273-2289 abrégé page 34 page 29</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1,8-10, 13,14,16

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 février 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/02/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R



C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ROSEIRO J C ET AL: "BATCH AND FED-BATCH CULTIVATION OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS IN CAROB EXTRACTS" LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT & TECHNOLOGIE, vol. 25, no. 3, 1992, pages 289-293, XP000922972 ISSN: 0023-6438 le document en entier -----	1,8-10, 13,14,16



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA
COMMUNICATION DE LA DEMANDE
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

DUBRUC, Philippe
Rhodia Services
25, quai Paul Doumer
F-92408 Courbevoie Cedex
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 mars 2001 (15.03.01)		
Référence du dossier du déposant ou du mandataire R 99110		AVIS IMPORTANT
Demande internationale no PCT/FR00/02452	Date du dépôt international (jour/mois/année) 06 septembre 2000 (06.09.00)	
Déposant RHODIA CHIMIE etc		Date de priorité (jour/mois/année) 07 septembre 1999 (07.09.99)

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:
AU, KP, KR, US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:
AE, AG, AL, AM, AP, AT, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EA, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1a-bis)).
3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 15 mars 2001 (15.03.01) sous le numéro WO 01/18226

RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

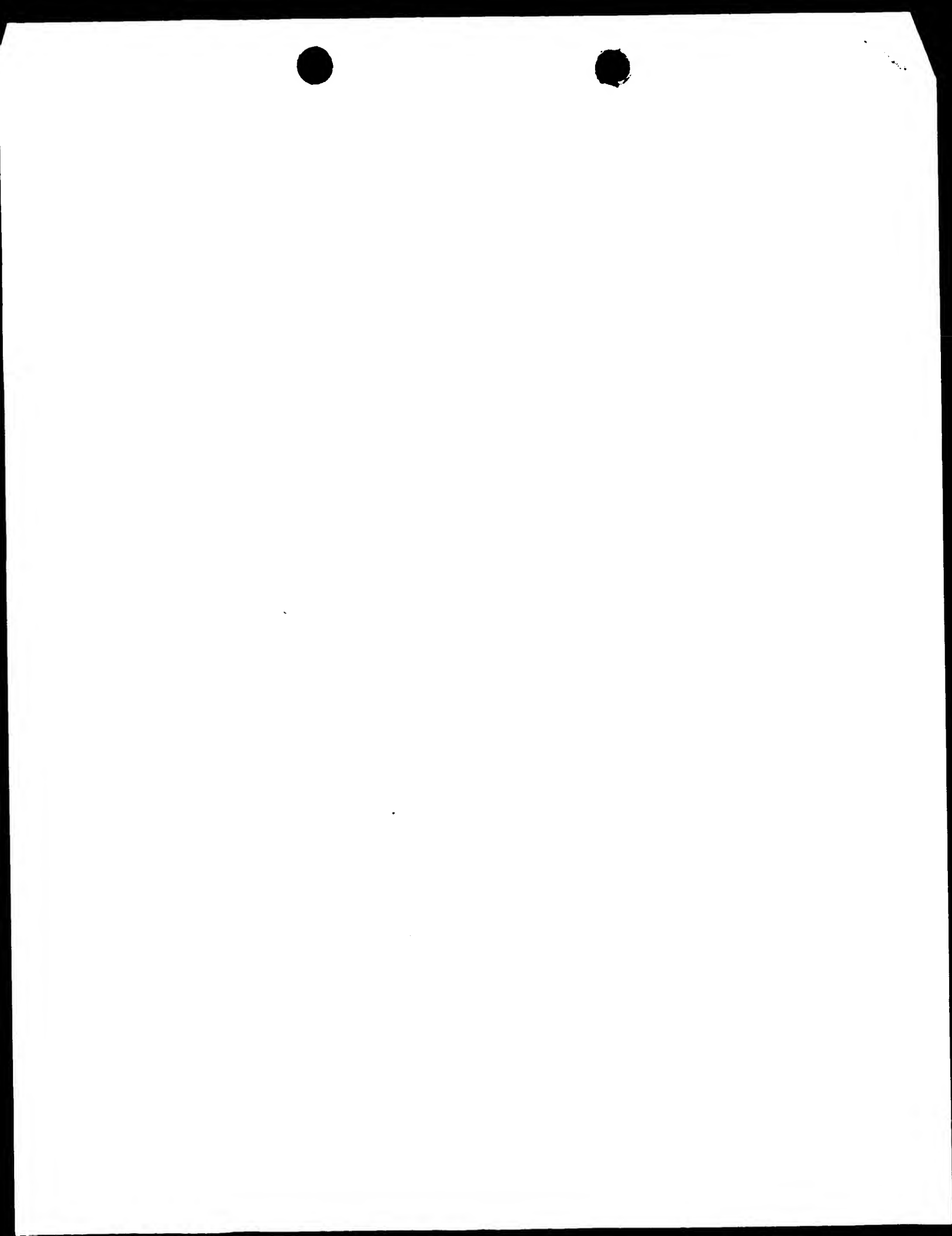
Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé J. Zahra
no de télécopieur (41-22) 740.14.36	no de téléphone (41-22) 338.83.38

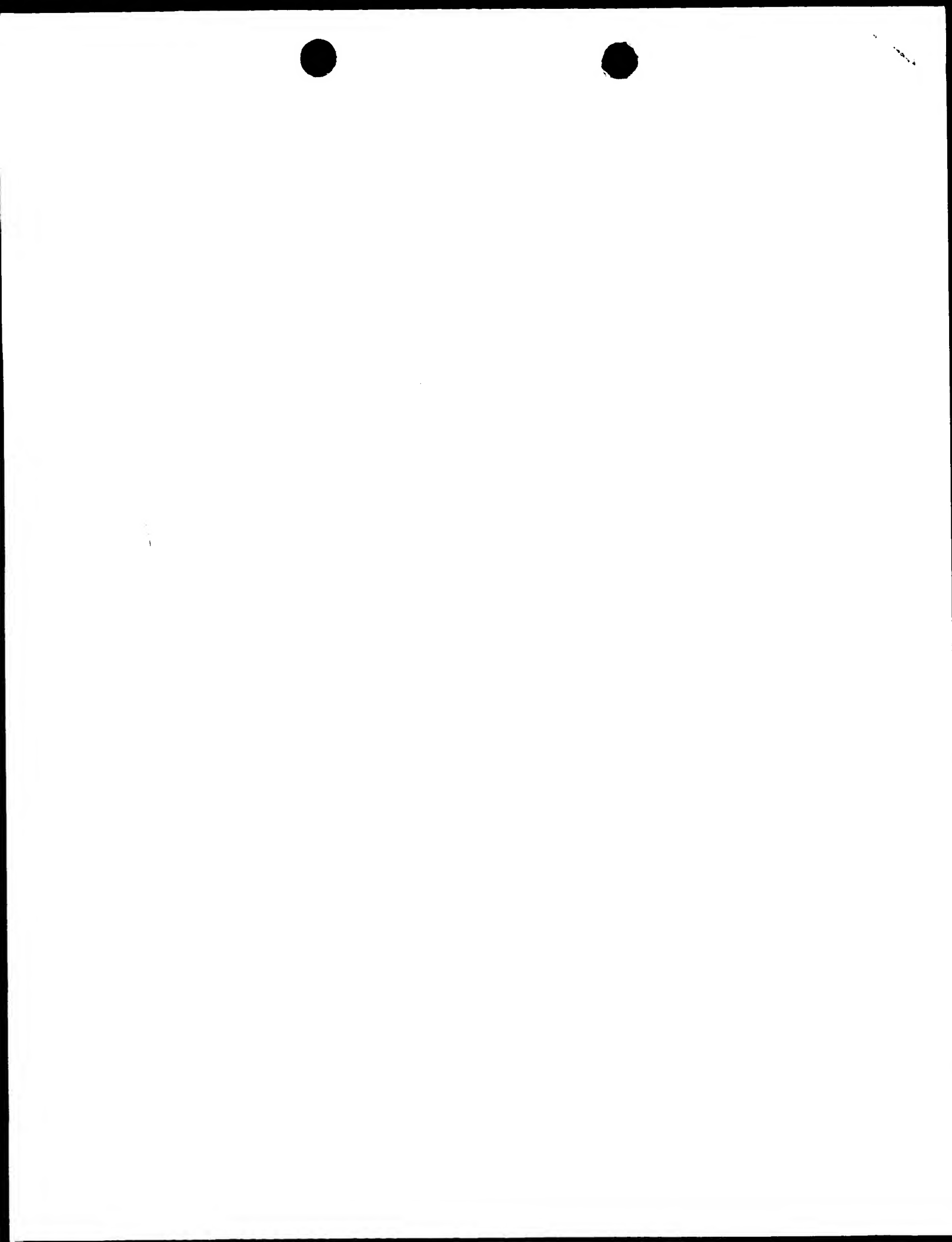


Suite du formulaire PCT/IB/308

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE
LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 mars 2001 (15.03.01)	AVIS IMPORTANT
Référence du dossier du déposant ou du mandataire R 99110	Demande internationale no PCT/FR00/02452

Il est notifié au déposant que, au moment de l'établissement du présent avis, le délai fixé à la règle 46.1 pour le dépôt de modifications selon l'article 19 n'était pas encore expiré et que le Bureau international n'avait pas reçu de modifications ni de déclaration l'informant que le déposant ne souhaitait pas présenter de modifications.



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

(2)

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

INFORMATIONS RELATIVES AUX
OFFICES ELUS QUI ONT RECU
NOTIFICATION DE LEUR ELECTION

(règle 61.3 du PCT)

Destinataire:

DUBRUC, Philippe
Rhodia Services
Direction de la Propriété
Industrielle
40, rue de la Haie-Coq
F-93306 Aubervilliers Cedex
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 29 octobre 2001 (29.10.01)		
Référence du dossier du déposant ou du mandataire R 99110		INFORMATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR00/02452	Date du dépôt international (jour/mois/année) 06 septembre 2000 (06.09.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 07 septembre 1999 (07.09.99)
Déposant RHODIA CHIMIE etc		

1. Le déposant est informé que le Bureau international a, conformément à l'article 31.7), notifié à chacun des offices suivants son élection:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AU, BG, CA, CN, CZ, DE, GB, IL, JP, KP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US

2. Les offices suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle ils sont notifiés de leur élection; la notification de leur élection leur sera envoyée par le Bureau international seulement à leur demande:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BR, BY, CH, CR, CU, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MW, MX, PT,
SD, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

3. Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices mentionnés ci-dessus avant l'expiration d'un délai de 30 mois à compter de la date de priorité. Pour ce faire, il doit payer la ou les taxes nationales et remettre, si elle est prescrite, une traduction de la demande internationale (article 39.1)a) ainsi que, le cas échéant, une traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3)b) et règle 74.1).

Certains offices ont fixé des délais supérieurs au délai mentionné ci-dessus. Pour des renseignements détaillés au sujet des délais applicables et des actes à accomplir à l'ouverture de la phase nationale auprès d'un office donné, voir le volume II du Guide du déposant du PCT.

L'ouverture de la phase régionale européenne est différée jusqu'à l'expiration d'un délai de 31 mois à compter de la date de priorité pour la totalité des Etats désignés aux fins de l'obtention d'un brevet européen.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Sean Taylor no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---



Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

Destinataire:

DUBRUC, P.
RHODIA SERVICES
40, rue de la Haie-Coq
F-93306 Aubervilliers Cedex
FRANCE

PCT

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE
INTERNATIONAL
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année) 02.11.2001

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
R 99110

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR00/02452

Date du dépôt international (jour/mois/année)
06/09/2000

Date de priorité (jour/mois/année)
07/09/1999

Déposant
RHODIA CHIMIE

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. **RAPPEL**

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Gallego, A

Tél. +49 89 2399-8102





TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL



(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire R 99110	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02452	Date du dépôt international (jour/mois/année) 06/09/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 07/09/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12P19/04		
Déposant RHODIA CHIMIE		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:
 - I ☒ Base du rapport
 - II ☐ Priorité
 - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
 - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
 - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
 - VI ☐ Certains documents cités
 - VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
 - VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 06/04/2001	Date d'achèvement du présent rapport 02.11.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Gohlke, P N° de téléphone +49 89 2399 8549 



**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02452

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-13 version initiale

Revendications, N°:

1-16 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :



**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02452

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-16
	Non : Revendications

**2. Citations et explications
voir feuille séparée**

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée



Il est fait référence aux documents suivants:

D1 = Roukas Triantafyllos et al.: "Evaluation of carob pod as a substrate for Pullulan production by Aureobasidium pullulans"; APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 55, no. 1, 1995, pages 27- 44, XP000915013.

D2 = Roseiro J C et al.: "Batch and fed-batch cultivation of Xanthomonas campresis in carob extracts"; LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT & TECHNOLOGIE, vol. 25, no. 3, 1992, pages 289-293, XP000922972.

Section V:

Aucun art antérieur disponible décrit le procédé de production d'exopolysaccharides selon les revendications 1 à 15 et l'exopolysaccharide ainsi obtenu selon la revendication 16, caractérisé notamment par fermentation de microorganismes dans un milieu nutritif dérivant d'une fraction de la **graine de caroube** (riches en protéines et sucres).

Il est connu que le fruit du caroubier (carob pod) est constitué de deux parties, la cosse (kibble) et la graine (seed) (voir par exemple D1, page 28, ligne 5).

D1 décrit le procédé de production de pullulane par fermentation de Aureobasidium pullulans dans un milieu nutritif dérivant d'un extrait de caroube riche en sucres. Cet extrait est obtenu à partir du fruit du caroubier, duquel on retire la graine et la cosse est ensuite traitée pour en extraire les sucres = extrait de caroube (voir D1 page 29, deuxième paragraphe "Preparation of fermentation medium"). Ainsi le milieu nutritif utilisé dans D1 **ne comprend pas la graine** de caroube, il est seulement constitué à partir de la cosse pauvre en protéines et riche en sucres (voir composition mentionnée page 28, lignes 8-11).

D2 décrit le procédé de production de xanthane par fermentation de Xanthomonas campresis dans un milieu nutritif dérivant d'un extrait de caroube riche en sucres (= "carob extract" ou "carob syrup"; voir notamment page 290, col. de droite, lignes 8-12). Cet extrait de caroube est, comme dans D1, obtenu à partir de la cosse du fruit de caroube ("in the form of kibbles"; cf. page 289, col. de droite, dernier paragraphe). Ainsi le milieu nutritif utilisé dans D2 **ne comprend pas la graine** de caroube.

Le procédé de la présente demande est donc nouveau. D'autre part ce procédé permet



l'obtention d'exopolysaccharides présentant une luminosité et une brillance jamais observées avec n'importe quel autre milieu nutritif (voir page 13, dernière phrase de la présente demande); les exopolysaccharides ainsi obtenus tels que revendiqués dans la revendication 16 sont donc aussi nouveaux. D'autre part, ils satisfont aux exigences organoleptiques, sensorielles et visuelles recherchées dans l'industrie alimentaire ou cosmétique dans lesquelles ils sont utilisés.

Ainsi l'objet des **revendications 1 à 16** semble répondre aux conditions des articles 33(2) et (3) du PCT.

Section VII:

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents **D1** et **D2** et ne cite pas ces documents.

Section VIII:

Les modes de réalisation de l'invention décrits à la page 6, lignes 32-34 ne sont pas couverts par les revendications. Ce défaut de concordance entre les revendications et la description semble indiquer que l'objet de la protection est différent de celui qui a été défini dans les revendications. Il en résulte un manque de clarté (article 6 PCT) lorsque les revendications sont interprétées à la lumière de la description. Le demandeur est prié de supprimer cette discordance.



✓

Translator's Report/Comments

Your ref: TR11434

Your order of (date):

In translating the above text we have noted the following apparent errors/unclear passages:

Page/para/line*	Comment
2/24	était → étaient
3/29	Erwinia
3/32	'appartenant' missing
7/12	gentiobiose
11/26,30; 12/2,21,37	Qsp/qsp - replace by figures?
12/24,25	gr => g
12/24	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \Rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
14/20	repetition of "en poids"
15/12	g/ <u>l</u>
15/14	caractérisé en <u>ce que</u>
23/25	utilisé
31/3	sources

* This identification refers to the source text. Please note that the first paragraph is taken to be, where relevant, the end portion of a paragraph starting on the preceding page. Where the paragraph is stated, the line number relates to the particular paragraph. Where no paragraph is stated, the line number refers to the page margin line number.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 00/02452

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P19/04 C12P19/06 C12N1/14 C12N1/20 C08B37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12P C12N C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
FSTA, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROUKAS TRIANTAFYLLOS ET AL: "Evaluation of carob pod as a substrate for pullulan production by Aureobasidium pullulans." APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 55, no. 1, October 1995 (1995-10), pages 27-44, XP000915013 ISSN: 0273-2289 abstract page 34 page 29 -/-	1,8-10, 13,14,16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 February 2001

Date of mailing of the international search report

21/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 00/02452

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ROSEIRO J C ET AL: "BATCH AND FED-BATCH CULTIVATION OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS IN CAROB EXTRACTS"</p> <p>LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT & TECHNOLOGIE, vol. 25, no. 3, 1992, pages 289-293, XP000922972</p> <p>ISSN: 0023-6438</p> <p>the whole document</p>	<p>1,8-10, 13,14,16</p>



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 mars 2001 (15.03.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/18226 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12P 19/04,
19/06, C12N 1/14, 1/20, C08B 37/00

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02452

(22) Date de dépôt international:
6 septembre 2000 (06.09.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/11176 7 septembre 1999 (07.09.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): RHO-
DIA CHIMIE [FR/FR]; 25, quai Paul Doumer, F-92408
Courbevoie Cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): NORE,
Olivier [FR/FR]; Villermat, F-79370 Beaussais (FR). SI-
MON, Jean-Luc [FR/FR]; 4, route de Limoges, F-79500
Melle (FR).

(74) Mandataire: DUBRUC, Philippe; Rhodia Services, 25,
quai Paul Doumer, F-92408 Courbevoie Cedex (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues.

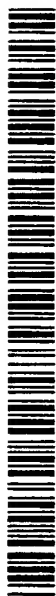
En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING EXOPOLYSACCHARIDES

(54) Titre: PROCEDE DE PRODUCTION D'EXOPOLYSACCHARIDES

(57) Abstract: The invention concerns a method for producing exopolysaccharides by fermenting micro-organisms characterised in that it consists in carrying out the fermentation in a nutrient medium comprising at least a source of carbon available to the micro-organisms and at least a source of nitrogen, said source being derived from a fraction of carob seed.

(57) Abrégé: La présente invention a pour objet un procédé de production d'exopolysaccharides par fermentation de microorganismes caractérisé en ce que l'on conduit la fermentation dans un milieu nutritif comportant au moins une source de carbone assimilable par les microorganismes et au moins une source organique d'azote, ladite source dérivant d'une fraction de la graine de caroube.



WO 01/18226 A1



PROCEDE DE PRODUCTION D'EXOPOLYSACCHARIDES

La présente invention a pour objet un procédé pour la production d'exopolysaccharides par fermentation au moyen de microorganismes. Plus spécifiquement, l'invention concerne un procédé pour la production
5 d'exopolysaccharides par fermentation de microorganismes dans un milieu nutritif comportant au moins une source de carbone assimilable par les microorganismes et au moins une source organique d'azote dérivant d'une légumineuse possédant une teneur élevée en protéines.

Dans le cadre de la présente invention, le terme exopolysaccharide désigne les
10 polysaccharides produits par des microorganismes.

Les exopolysaccharides de poids moléculaire élevé sont utilisés de manière croissante dans de nombreuses applications industrielles pour leurs propriétés épaississantes, viscosifiantes, émulsifiantes, stabilisantes dans les milieux notamment aqueux. Ainsi, la gomme xanthane, en raison de ses propriétés rhéologiques
15 exceptionnelles, est utilisée dans des domaines aussi variés que le bâtiment, la peinture, le papier, le textile, les cosmétiques, l'alimentaire, l'agriculture, le traitement des eaux, le forage, la récupération du pétrole et autres.

Ces exopolysaccharides ont des poids moléculaires élevés, le plus souvent supérieurs à 1.10^6 g/mol (mesurés par perméation de gel), et sont constitués d'unités
20 de glucose, mannose, galactose, rhamnose, acide glucuronique, acide mannuronique, acide guluronique, avec éventuellement des dérivés acétate et pyruvate. Leur structure particulière et leurs propriétés sont décrites par exemple dans l'ouvrage Industrial Gums - Whistler - 2nd Edition - Chapters XXI-XXIII (1973).

Les exopolysaccharides sont produits avantageusement par culture aérobie de
25 microorganismes dans un milieu nutritif aqueux.

La gomme xanthane est produite par des bactéries du genre *Xanthomonas*. Les exopolysaccharides du même type peuvent être produits par une grande variété de microorganismes incluant parmi les plus notoires, ceux du genre *Agrobacterium*,
30 *Arthrobacter*, *Alcaligenes* (Succinoglycane), *Pseudomonas* (Levan), *Rhizobium*, *Sclerotium* (Scleroglucane).

Le milieu nutritif aqueux comprend normalement, outre des éléments de croissance variés, une source de carbone et une source d'azote. Dans les fermentations industrielles, le choix de la source de carbone et/ou de la source d'azote est basé à la fois sur sa disponibilité, sur son coût et sur son aptitude à permettre des
35 productivités élevées.

Dans certaines industries comme par exemple l'industrie alimentaire ou cosmétique, des contraintes supplémentaires interviennent. Dans ces domaines, les sources de carbone et d'azote doivent, en outre, être choisies de manière à obtenir des

exopolysaccharides satisfaisant aux exigences organoleptiques, sensorielles, et visuelles recherchées.

Parmi les sources de carbone et d'azote habituellement utilisées, il n'est pas facile de trouver des sources qui répondent à la fois à toutes les exigences précitées.

5 Par exemple, dans les cas où le microorganisme n'est pas capable de consommer la totalité de la source d'azote, il reste des produits résiduels insolubles en fin de fermentation qui d'une part rendent le milieu propice au développement de souches contaminantes pouvant dégrader le goût avant séparation de l'exopolysaccharide, et d'autre part risquent de colorer l'exopolysaccharide lors des
10 traitements thermiques de stérilisation et de clarification éventuels. Dans certains procédés de fermentation, pour remédier à cet inconvénient on propose d'utiliser des enzymes. D'autres mettent en œuvre des étapes de filtration et/ou de centrifugation. Quel que soit le procédé d'élimination de produits résiduels insolubles de fin de fermentation, il en résulte un coût de production accru.

15 Certaines sources de carbone et/ou d'azote présentent l'inconvénient d'allonger considérablement le cycle de fermentation entraînant notamment la contamination et donc la dégradation du goût avant séparation de l'exopolysaccharide, et la perte de production.

20 La nature de la source d'azote est particulièrement importante lorsque l'on cherche à obtenir un exopolysaccharide présentant de bonnes propriétés organoleptiques, sensorielles et visuelles. Elle est aussi responsable de la bonne productivité de l'exopolysaccharide.

Il a été constaté que certaines sources dérivant d'une fraction de la graine de certaines légumineuses comme la caroube, était une source d'azote organique
25 particulièrement intéressante dans la fermentation des microorganismes. Ces fractions se sont avérées satisfaire à l'ensemble des exigences précitées.

Parmi les fractions dérivant de la graine de caroube, celles possédant avantagement une teneur élevée en protéines donnent des résultats particulièrement intéressants notamment en terme de productivité. Sur des milieux dit
30 standards tels que ceux mentionnés par exemple dans l'ouvrage Industrial Gums – Whistler – 2nd Edition – Chapters XXI-XXIII (1973), pour des fermentations témoin, les productivités sont de l'ordre de 0,3 à 0,4 g/(kg.h) ; pour les fractions dérivant de la graine de caroube cette productivité est supérieure à 0,4 g/(kg.h).

35 La présente invention a pour but de proposer un procédé de production d'exopolysaccharides par fermentation de microorganismes qui soit simple et économique.

Un autre but de l'invention est de proposer un procédé de production d'exopolysaccharides par fermentation de microorganismes qui évite les problèmes de contamination exposés ci-dessus.

5 Ainsi, l'invention a pour objet un procédé de production d'exopolysaccharides par fermentation de microorganismes caractérisé en ce que l'on conduit la fermentation dans un milieu nutritif comportant au moins une source de carbone assimilable par les microorganismes et au moins une source organique d'azote, ladite source dérivant d'une fraction de la graine de caroube.

Les autres avantages liés au choix notamment de la source d'azote sont la réduction de la durée des fermentations, la suppression de produits résiduels de fin de fermentation et une productivité améliorée.

De plus, ce procédé permet d'obtenir un exopolysaccharide ayant de bonnes propriétés organoleptiques, sensorielles et visuelles.

Par ailleurs, les propriétés rhéologiques de l'exopolysaccharide obtenu par ce procédé sont préservées et même dans certains cas améliorées.

Le procédé de l'invention est susceptible d'être appliqué à la production de tout exopolysaccharide par fermentation au moyen de microorganismes. De nombreux microorganismes tels que bactéries, levures, champignons, algues, sont capables de produire des exopolysaccharides. On peut citer entre autres :

- 20 ▪ des bactéries appartenant au genre *Xanthomonas* et plus particulièrement aux espèces décrites dans Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8^e édition – 1974 – Williams N. Wilkins Co. Baltimore) telles que *Xanthomonas begoniae*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas carotae*, *Xanthomonas hederae*, *Xanthomonas incanae*, *Xanthomonas malvacearum*, *Xanthomonas papavericola*,
25 *Xanthomonas phaseoli*, *Xanthomonas pisi*, *Xanthomonas vasculorum*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas vitians*, *Xanthomonas pelargonii* ;
- des bactéries appartenant au genre *Arthrobacter* et plus particulièrement les espèces *Arthrobacter stabilis*, *Arthrobacter viscosus* ;
- des bactéries appartenant au genre *Erwinia* ;
- 30 ▪ des bactéries appartenant au genre *Azotobacter* et plus particulièrement l'espèce *Azotobacter indicus* ;
- des bactéries au genre *Agrobacterium* et plus particulièrement les espèces *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium tumefaciens* ;
- des bactéries appartenant au genre *Alcaligenes* et plus particulièrement
35 *Alcaligenes faecalis* ;
- des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* et plus particulièrement *Pseudomonas methanica* ;
- des bactéries appartenant au genre *Corynebacterium* ;

- des bactéries appartenant au genre *Bacillus* et plus particulièrement *Bacillus polymyxa* ;
- des champignons appartenant au genre *Sclerotium* et plus particulièrement aux espèces *Sclerotium glucanicum*, *Sclerotium rolfsii* ou *Plectania occidentalis* ;
- 5 ▪ des champignons appartenant au genre *Aspergillus* et plus particulièrement aux espèces *Aspergillus itaconicus*, *Aspergillus terreus* ;
- des levures appartenant au genre *Hansenula* comme l'espèce *Hansenula capsulata*.

10 De préférence le microorganisme est une bactérie du genre *Xanthomonas* et plus particulièrement de l'espèce *Xanthomonas campestris*.

L'invention a pour objet principal un procédé de production d'exopolysaccharides par fermentation de microorganismes caractérisé en ce que l'on conduit la fermentation dans un milieu nutritif comportant au moins une source de carbone assimilable par les microorganismes et au moins une source organique d'azote, ladite source étant dérivée
15 d'une fraction de la graine de caroube.

L'arbre de caroubier produit un fruit, constitué de deux parties, la cosse et la graine. La graine de caroube, et plus particulièrement la fraction endosperme de cette graine, est déjà largement valorisée sous la dénomination "gomme de caroube". Contigu à cette fraction endosperme, se trouve le germe qui est un sous produit obtenu
20 en quantités importantes lors de l'isolement de la gomme de caroube.

Parmi les différentes fractions de la graine de caroube, il s'est avéré que toutes celles ayant une teneur élevée en protéines étaient plus particulièrement adaptées au procédé de la présente invention.

Ainsi, la fraction de la graine de caroube possède avantageusement une teneur
25 en protéines d'au moins 45 %, de préférence d'au moins 50 %, et plus préférentiellement d'au moins 60 %, en poids par rapport au poids sec de la matière sèche.

La teneur en protéine est calculée à partir de la mesure de l'azote libéré par combustion à 950°C sous oxygène et mesuré par conductivité dans un flux d'hélium.
30 L'appareillage utilisé est un LECO FP 428.

Ces protéines sont constituées aussi bien des acides aminés essentiels que des acides aminés non essentiels.

Un mode de réalisation particulier de l'invention consiste à mettre en œuvre des fractions de la graines de caroube dont les protéines ont avantageusement un taux
35 élevé en arginine, en glutamine et/ou en acide glutamique, et en lysine.

Dans ce mode particulier, la teneur en arginine est avantageusement comprise entre 9 et 20 %, et de préférence entre 12 et 14 %, poids/poids par rapport à l'ensemble des acides aminés.

De la même façon, la teneur en glutamine et/ou acide glutamique est avantageusement comprise entre 18 et 30 %, de préférence entre 22 et 27%, poids/poids par rapport à l'ensemble des acides aminés.

La teneur en lysine est avantageusement comprise entre 18 et 30 %, de préférence entre 12 et 14 %, poids/poids par rapport à l'ensemble des acides aminés.

La teneur en acides aminés est déterminée par des méthodes classiques et connues de l'homme du métier.

Outre les protéines, les fractions peuvent également comporter des lipides. Les exopolysaccharides produits par fermentation de microorganismes dans un milieu nutritif comportant au moins une source organique d'azote dérivée d'une fraction de la graine de caroube comportant des lipides, voient plus particulièrement leurs propriétés organoptiques, visuelles et sensorielles sensiblement améliorées. Ces lipides empêchent également le moussage dans les phases de préculture.

Avantageusement, la teneur en lipides dans lesdites fractions est d'au moins 4%, avantageusement d'au moins 5 %, et encore plus avantageusement varie entre 7 et 15% en poids par rapport à la matière sèche.

La teneur en lipides est ramenée à celle de la matière grasse totale. Elle est déterminée par extraction à l'hexane dans un extracteur Soxhlet. Le mode opératoire est le suivant :

- on pèse dans la cartouche de l'extracteur, environ exactement 10 g de farine de germe de caroube, soit E grammes, obturés avec un tampon de coton hydrophile ;
- on introduit dans un ballon de 250 ml, préalablement taré (P0 gramme), 150 ml d'hexane ;
- on extrait pendant environ 6 heures ;
- on évapore le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif et on termine le séchage du résidu dans une étuve à 105°C pendant 1 heure ;
- après refroidissement dans un dessiccateur, on pèse le ballon contenant le résidu, soit P1 grammes.

La teneur en matière grasse et donc en lipides est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en matière grasse (\%)} = 100 \times (P1 - P0) / E$$

Parmi les composants caractéristiques présents dans ces lipides, on peut citer notamment les acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique.

Outre les protéines et les lipides, les fractions de la graine de caroube peuvent aussi comporter des hydrates de carbone.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, ladite fraction est le germe de la graine de caroube.

Dans ce mode de réalisation, ladite fraction est préalablement débarassée de ses fractions endospermes selon les méthodes classiques connues.

5 La fraction de la graine de caroube utilisée peut être de préférence sous forme d'une farine. La farine est obtenue par des moyens classiques de broyage tels que broyage dans des moulins du type :

- moulins à cylindre pour les farines de granulométrie moyenne type mesh 100, c'est-à-dire une farine présentant au plus 1 % en masse de particules supérieures à 80 mesh et au plus 10 % en masse de particules inférieures à 200 mesh ;

- moulins à broches (pin mills) pour les farines de granulométrie plus fine :

▫ type mesh 200, c'est-à-dire une farine ne présentant pas de particules supérieures à 80 mesh et présentant au plus 60 % en masse de particules inférieures à 200 mesh, et

15 ▫ type mesh 175, c'est-à-dire une farine présentant au plus 1 % en masse de particules supérieures à 80 mesh et au plus 75 % en masse de particules inférieures à 200 mesh.

20 La farine peut être utilisée telle quelle ou après traitement par des enzymes adaptées comme par exemple des protéases alcalines, acides et/ou neutres ; des lipases ; des phytases ; des phosphatases alcalines, acides et/ou neutres ; des amylases. Le traitement par les enzymes se fait par des méthodes classiques et connues.

25 La granulométrie de ladite farine peut fluctuer entre 10 et 150 microns. Dans le cas des farines traitées, cette granulométrie est plus particulièrement de 20 à 60 microns, de préférence d 30 à 50 microns.

Les mesures de granulométrie peuvent être réalisées par la technique de granulométrie laser, à l'aide d'un granulomètre MALVERN, commercialisé par la société Malvern Instruments S.A.

30 On peut également envisager d'utiliser la fraction de la graine de caroube telle quelle, c'est-à-dire après séparation de l'endosperme sous forme de plaquettes, ou encore sous forme d'une pré-dispersion ou pré-suspension aqueuse.

Bien que l'invention soit décrite pour la graine de caroube, elle peut également s'appliquer à d'autres légumineuses comme par exemple le guar, le cassia, le tara. Ces légumineuses sont citées à titre indicatif et non limitatif.

35 Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, la fermentation a lieu avec un mélange de sources d'azote organiques et minérales.

Dans ce cas, la source d'azote minérale peut être choisie parmi les nitrates d'ammonium ou de sodium, les phosphates ou les sulfates d'ammonium, sulfate de magnésium, sulfate de potassium ou de sodium, seuls ou en mélange.

La concentration en sources organiques et éventuellement minérales d'azote dans le milieu de fermentation est comprise entre 1 et 80 g/l, de préférence entre 3 et 50 g/l, et plus préférentiellement entre 5 et 30 g/l.

Le milieu de fermentation renferme également une source de carbone assimilable par les microorganismes.

A titre de source de carbone constitutive du milieu de fermentation, on peut citer le glucose, le saccharose, le fructose, le galactose, le tréhalose, le mannose, le mélobiose, le raffinose, le maltotriose, le maltose, le lactose, le lactulose, le méthyl- β -galactopyranoside, le méthyl- α -galactopyranoside, le cellobiose, le gentobiose, le méthyl- β -D-glucopyranoside, le méthyl- α -D-glucopyranoside, l'esculine, le ribose, l'arabinose, le xylose, le palatinose, le rhamnose, le fucose, le mélézitose, le D(+) arabitol, le L(-) arabitol, le xylitol, le dulcitol, le tagatose, le glycérol, le myo-inositol, le mannitol, le maltitol, le turanose, le sorbitol, l'adonitol, le lyxose, l'érythritol, l'amidon avantageusement hydrolysé, les hydrolysats d'amidon, les mélanges de ces sucres, et les mélanges comprenant au moins un de ces sucres. Le glucose et le saccharose sont les sucres préférés.

La concentration en source de carbone assimilable est comprise entre 1 et 100 g/l, et de préférence entre 15 et 80 g/l.

Le milieu de fermentation peut, en outre, renfermer des oligo-éléments tels que des traces de sels minéraux tels que sulfates, chlorures de fer, de calcium, de manganèse, de magnésium, de sodium, de potassium, de nickel, de cobalt, de cuivre, de zinc ou leur mélange, ainsi que des vitamines, des nucléotides et/ou d'autres additifs conventionnels tels que des agents de contrôle de pH et des agents anti-moussants.

Le procédé de production d'exopolysaccharides selon l'invention par fermentation de microorganismes peut éventuellement se faire en présence d'enzyme(s) tels que des protéases alcalines, acides et/ou neutres ; des polysaccharases ; des amidases ; des peptidases, amyloglucosidases, phosphatases ; phytases.

Cependant, un des avantages importants du procédé selon l'invention réside dans le fait que l'on peut conduire la fermentation des microorganismes en l'absence d'enzyme. Il a été constaté de manière tout à fait surprenant qu'en l'absence d'enzyme, ni la durée ni la productivité du procédé de fermentation n'étaient affectées. De plus, la suppression d'enzyme n'a pas entraîné une accumulation des produits résiduels insolubles et non dissouts en fin de fermentation qui peuvent rendre le milieu propice au développement de souches contaminantes pouvant dégrader le moût avant séparation de l'exopolysaccharide.

La culture pure des microorganismes peut être effectuée de manière classique. L'homme du métier, en fonction du microorganisme sera en mesure de choisir les conditions notamment les températures et temps d'incubation, et la nature du milieu d'entretien dudit microorganisme.

- 5 Pour la conservation du microorganisme, il est préférable de prévoir au moins une étape de préculture. Par préculture, on entend une étape qui consiste à développer et à multiplier la souche bactérienne, sans production d'exopolysaccharide.

Le microorganisme est introduit dans le milieu de fermentation de manière connue en soi à l'aide d'inoculums ou de cultures intermédiaires.

10

La fermentation peut être réalisée à des pressions comprises entre 0 et 4 bar.

On peut conduire la fermentation à une température comprise entre 15 et 100°C, de préférence entre 25 et 80°C, et plus particulièrement entre 25 et 35°C.

- 15 Le pH du milieu de fermentation peut varier entre 5 et 9, et de préférence entre 6 et 8. Le pH peut être ajusté, selon le cas, avec une base telle que la soude, la potasse, ou l'ammoniaque, ou avec un acide tel que l'acide sulfurique, l'acide phosphorique, l'acide chlorhydrique ou l'acide nitrique.

- 20 Le milieu de fermentation, placé dans une cuve ou un récipient de fermentation, peut être avantageusement soumis à une agitation et à une aération. Cette agitation peut être exercée par exemple au moyen d'un secoueur réciproque, d'un secoueur giratoire, d'un ou plusieurs mobile(s) d'agitation ou d'une colonne à bulles. Le temps de fermentation est habituellement supérieur à 30 heures, mais généralement compris entre 40 et 100 heures.

- 25 La productivité est mesurée en fonction de la quantité d'exopolysaccharide produit, exprimée en grammes, par rapport au kg de moût, par heure de fermentation. Avec le procédé de l'invention, une amélioration en productivité de 3 à 15 %, et de préférence de 5 à 10 % a été observée.

- 30 Après achèvement de la fermentation, l'exopolysaccharide peut être récupéré du moût et purifié selon les méthodes connues telles que filtration, concentration, cristallisation ou extraction par solvants.

L'invention couvre également les exopolysaccharides obtenus ou susceptibles d'être obtenus par le procédé. Elle couvre plus particulièrement la gomme xanthane produite par le procédé de l'invention.

- 35 La gomme xanthane obtenue selon le procédé de l'invention, en solution aqueuse à 1% dans l'eau distillée, présente une transparence élevée, c'est-à-dire de l'ordre de 70 à 95 % ou encore de l'ordre de 80 à 95%. La transmittance de la solution aqueuse est mesurée par spectrophotométrie à 600 nm.

Les exemples suivants illustrent la présente invention sans toutefois en limiter la portée .

5 **EXEMPLES**

Exemple 1

Cet exemple décrit les phases de préculture 1 et 2 pour le *Xanthomonas campestris*.

10 Préculture 1 :

Composition du milieu de préculture :

- | | | | |
|----|--|--------|-----------|
| | - Extrait de levure | 3 g/l | Oxoïd |
| | - Extrait de malt | 3 g/l | Oxoïd |
| 15 | - peptone de soja | 5 g/l | Oxoïd |
| | - Saccharose | 10 g/l | Eurosucre |
| | - pH ajusté à 7 par H ₂ SO ₄ | | |
| | - qsp 1 litre avec de l'eau potable | | |

20 Tous les constituants sont mis en solutions dans 1 litre d'eau potable, homogénéisés par agitation magnétique et répartis dans les erlenmeyers de 500 ml par fraction de 112 ml.

La préparation est autoclavée 30 minutes à 120°C.

La souche est initialement conservée sous la forme de tubes congelés à -196°C par le procédé de congélation dans les vapeurs d'azote liquide.

25

Pour une congélation azote liquide, on réalise une préculture sur un milieu spécifique ayant la composition suivante :

- | | | | |
|----|--------------------------|------|-----------------------------|
| | ▫ extrait de malt | 3 g | (procuré auprès de Oxoïd) |
| | ▫ extrait de levure | 3 g | (Oxoïd) |
| 30 | ▫ peptone de soja | 5 g | (Oxoïd) |
| | ▫ glucose | 10 g | (procuré auprès de Prolabo) |
| | ▫ eau de source qsp 1 l. | | |

35 Pour la préparation du milieu, tous les ingrédients sont dispersés dans l'eau de source. Le pH est ajusté à 6,5 avec H₂SO₄ 10 %. Le milieu est stérilisé 20 minutes à 120°C, à l'autoclave.

Après 24 heures d'incubation à 28°C sur secoueur giratoire à 220 tr/min et amplitude = 50 mm, 10 % en volume de glycérol pur stérile sont ajoutés à la culture. La

culture est ensuite répartie dans des cryotubes de contenances variant de 1 ml à 10 ml, de préférence de 2 ml à 4 ml.

Ces tubes sont conservés dans les vapeurs d'azote liquide.

5 La préculture 1 est ensemencée à l'aide d'un cryotube préalablement décongelé à l'air ambiant. La totalité ou 50 % du cryotube sont introduits de façon stérile dans les erlenmeyers de 500 ml, dont le milieu a été autoclavé et donc stérilisé de la façon décrite ci-dessus.

10 Le milieu ainsiensemencé est incubé 24 heures à 28°C sur un secoueur giratoire à 220 tr/mn et une amplitude de 50 mm.

Après 24 heures d'incubation nous obtenons une préculture dont le pH varie de 7 à 7,5, dont la viscosité est comprise entre 50 et 500 mPa.s et dont la population bactérienne en *Xanthomonas campestris* est supérieure à 10^{10} /ml.

Préculture 2 :

La préculture 1 sert pour ensemer la préculture 2.

Composition du milieu de préculture 2 :

20	- Saccharose	10 g/l	Eurosucre
	- Farine de germe de caroube	4 g/l	Meyhall AG
	- Na ₂ HPO ₄	3 g/l	Europhos
	- Eau potable ou eau adoucie	qsp 1 litre	
	- pH ajusté à l'acide sulfurique 10% pour avoir 6,5 avant stérilisation.		

25

Tous les constituants sont mis en suspension dans 1 litre d'eau potable et le pH est ajusté à 6,5. Le milieu complet est autoclavé pendant 30 mn à 120°C après avoir réparti ce dit milieu dans des erlenmeyers de 500 ml par fraction de 112 ml.

30 Ces erlenmeyers sont ensuiteensemencés avec 0 ;1 à 0 ;2ml de la préculture 1. Ces erlenmeyers sont mis à incuber 24 à 30 heures heures à 28°C sur un secoueur giratoire à 220 tr/mn et une amplitude de 50 mm.

Après 24 à 30 heures d'incubation nous obtenons une préculture dont le pH varie de 5,8 à 7,1, dont la viscosité est comprise entre 100 et 1000 mPa.s et dont la population bactérienne en *Xanthomonas campestris* est supérieure à 10^9 /ml

Exemple 3

Cet exemple décrit la préparation et l'obtention de l'exopolysaccharide selon deux procédés de fermentation, l'un avec une source d'azote organique et l'autre avec une source mixte d'azote organique et d'azote minérale.

- 5 Dans cet exemple deux étapes de "préculture" interviennent. Ces étapes ont lieu en erlenmeyers de 500 ml, ce qui correspond à 100 ml de milieu (voir les exemples 1 et 2).

- 10 L'étape de production qui correspond à l'étape au cours de laquelle la souche bactérienne produit le polysaccharide, a lieu en fermenteur de 20 litres, dont 15 litres utiles.

Etape préculture 1 et 2:

Les étapes de préculture 1 et 2 sont effectuées de la même manière que dans les exemples 1 et 2.

- 15 Etape de production :

Milieu1 :

La dernière étape est l'étape de production de l'exopolysaccharide.

Le milieu du fermenteur 1 a la composition suivante :

- | | | | |
|----|------------------------------|---------|------------|
| 20 | ▫ saccharose | 42 g | Eurosucre |
| | ▫ Farine de germe de caroube | 6 g | Meyhall AG |
| | ▫ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,25 g | Bittersalz |
| | ▫ Na_2HPO_4 | 2 g | Prolabo |
| | ▫ antimousse organique | 0,5 ml | |
| | ▫ eau potable ou adoucie | qsp 1 l | |

- 25 La préparation des sources azotées et de carbohydrates est réalisée séparément.

Saccharose ⇒ Qsp grammes de glucose sont dissous dans qsp 3 l d'eau adoucie ou potable dans un flacon de Mariotte. Le pH est abaissé à 5,2 par H_2SO_4 10 %. La solution est stérilisée en flacon de Mariotte 45 minutes à 120°C à l'autoclave.

- 30 Farine de germe de caroube + sels ⇒ Qsp grammes de farine de germe de caroube, 30 g de Na_2HPO_4 , 3,75 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, et 7,5 ml d'antimousse sont dissous dans qsp 7 l d'eau adoucie. Le pH est ajusté à 6 avec H_2SO_4 10 %. Ce mélange est stérilisé *in situ* 45 minutes à 120°C.

- 35 Soude 1N ⇒ 40 g de pastilles de NaOH sont dissous dans qsp 1l d'eau distillée. La solution est stérilisée en flacon de Mariotte 30 minutes à 120°C à l'autoclave.

Quand tous les ingrédients sont à 28°C, ils sont mélangés dans le fermenteur. Le fermenteur est ensuite inoculé avec qsp de préculture 2.

Les conditions de fermentation dans le fermenteur sont les suivantes :

- Agitation \Rightarrow 200 tr/min de 0 à 20 heures d'âge, puis 400 tr/min. jusqu'à la fin de la fermentation
- Aération \Rightarrow 400 l/h de 0 à 18 heures puis 825 l/h de 24 heures jusqu'à la fin de la fermentation
- La température est régulée à 28°C.
- Le pH est régulé à 6,8 par NaOH 1N.
- La pression est la pression atmosphérique .

Milieu 2 :

Le milieu 2, qui peut être une alternative au milieu 1, a la composition suivante :

	▫ Saccharose	42 g/l	(Eurosucré)
15	▫ NH_4NO_3	1,15 g/l	(Atochem)
	▫ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g/l	(Bitter salz)
	▫ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,217 g/l	(Europhos)
	▫ Soluble de farine de germe de caroube	36 g/l	(Meyhall AG)
	▫ antimousse organique	0,2 ml	
20	▫ eau adoucie qsp 1 l		

Saccharose \Rightarrow Qsp grammes de glucose sont dissous dans qsp 3 l d'eau adoucie. Le pH est ajusté à 5 par H_2SO_4 10 %. La solution est stérilisée en flacon de Mariotte 30 minutes à 120°C à l'autoclave.

- Azote + sels \Rightarrow 17.25 g de NH_4NO_3 , 3.75 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.22 gr de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 525 gr de soluble de farine de germe de caroube et 3 ml d'antimousse sont dissous dans qsp 7l d'eau adoucie. Le pH de cette solution est ajusté à 6 avec H_2SO_4 10 %. Ce mélange est stérilisé *in situ* 45 minutes à 120°C.

Soude 1N \Rightarrow 40 g de pastilles de NaOH sont dissous dans qsp 1l d'eau distillée. La solution est stérilisée en flacon de Mariotte 30 minutes à 120°C à l'autoclave.

- Le soluble de farine de germe de caroube est préparé par dilution de farine à 6 à 15% dans de l'eau adoucie. Cette solution peut ou non être traitée par des enzymes type protéases alcalines, acides et/ou neutres ; des lipases ; des phytases ; des phosphatases alcalines, acides et/ou neutres ; des amylases, avant d'être décantée ou non sur un décanteur rotatif horizontal afin d'éliminer les impuretés pouvant nuire à la qualité du produit final.

Quand tous les ingrédients sont à 28°C, ils sont mélangés dans le fermenteur (milieu 1 ou 2). Le fermenteur est ensuite inoculé avec qsp de préculture 2.

Les conditions de fermentation dans le fermenteur 2 sont les suivantes :

Agitation \Rightarrow 200 tr/min de 0 à 20 heures d'âge, puis 400 tr/min jusqu'à la fin de la fermentation

5 Aération \Rightarrow 400 l/h de 0 à 24 heures puis 825 l/h de 24 heures jusqu'à la fin de la fermentation

La température est régulée à 28°C.

Le pH est régulé à 6,8 par NaOH 1N.

La pression est la pression atmosphérique ou sous une pression pouvant aller de 0,5 à 4 bars.

10

Résultats de fermentation :

Selon le milieu de culture étudié, les durées de fermentations varient de 45 à 65 heures, les matières sèches précipitables à l'isopropanol varient de 20 à 30 g/kg, et le rendement pondéral par rapport à la source de carbone mise en oeuvre varie de 50 à 15 70 %. Le moût de fermentation obtenu présente une luminosité et une brillance jamais observées avec n'importe quelle autre source d'azote.

REVENDICATIONS

1. Procédé de production d'exopolysaccharides par fermentation de microorganismes caractérisé en ce que l'on conduit la fermentation dans un milieu nutritif comportant au moins une source de carbone assimilable par les microorganismes et au moins une source organique d'azote, ladite source dérivant d'une fraction de la graine de caroube.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la fraction de la graine de caroube possède une teneur en protéines d'au moins 45 %, de préférence d'au moins 50 %, et plus préférentiellement d'au moins 60 %, en poids par rapport au poids sec de la matière sèche.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les protéines ont avantageusement un taux élevé en arginine, en glutamine et/ou acide glutamique, et en lysine.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la fraction de la graine de caroube contient une teneur en lipides d'au moins 4 %, avantageusement d'au moins 5 %, et encore plus avantageusement varie entre 7 et 15% en poids en poids par rapport à la matière sèche.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la fraction est le germe de graine de caroube.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la fraction de la graine de caroube est sous forme d'une farine.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la granulométrie de la farine fluctue entre 10 et 150 microns.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'on conduit la fermentation dans un milieu nutritif comportant au moins une source minérale d'azote.
9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la source d'azote minérale est choisie parmi les nitrates d'ammonium ou de sodium, les phosphates ou les sulfates d'ammonium, sulfate de magnésium, sulfate de potassium ou de sodium, seuls ou en mélange.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la concentration en source organiques et éventuellement minérales d'azote dans le milieu de fermentation est comprise entre 1 et 80 g/l, de préférence entre 3 et 50 g/l, et plus préférentiellement entre 5 et 30 g/l.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la source de carbone assimilable est choisie parmi le glucose ou le saccharose.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la concentration en source de carbone assimilable est comprise entre 1 et 100 g/l, et de préférence entre 15 et 80 g/l.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en l'on conduit la fermentation des microorganismes en l'absence d'enzyme.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que l'on conduit la fermentation à une température comprise entre 15 et 100°C, de préférence entre 25 et 80°C, et plus particulièrement entre 25 et 35°C.

20

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que le microorganisme est choisi dans le groupe des bactéries du genre *Xanthomonas*, du genre *Alcaligenes*, du genre *Agrobacterium*, du genre *Arthrobacter*, du genre *Azotobacter*, du genre *Pseudomonas*, du genre *Corynebacterium*, des champignons du genre *Sclerotium*, du genre *Aspergillus*, et des levures du genre *Hansenula*.

25

16. Exopolysaccharide obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02452

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P19/04 C12P19/06 C12N1/14 C12N1/20 C08B37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

FSTA, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ROUKAS TRIANTAFYLLOS ET AL: "Evaluation of carob pod as a substrate for pullulan production by Aureobasidium pullulans." APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 55, no. 1, October 1995 (1995-10), pages 27-44, XP000915013 ISSN: 0273-2289 abstract page 34 page 29</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	<p>1,8-10, 13,14,16</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 February 2001

Date of mailing of the international search report

21/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ional Application No

PCT/FR 00/02452

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ROSEIRO J C ET AL: "BATCH AND FED-BATCH CULTIVATION OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS IN CAROB EXTRACTS"</p> <p>LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT & TECHNOLOGIE, vol. 25, no. 3, 1992, pages 289-293, XP000922972</p> <p>ISSN: 0023-6438</p> <p>the whole document</p>	<p>1,8-10, 13,14,16</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Donnée Internationale No
PCT/FR 00/02452

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12P19/04 C12P19/06 C12N1/14 C12N1/20 C08B37/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12P C12N C08B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

FSTA, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ROUKAS TRIANTAFYLLOS ET AL: "Evaluation of carob pod as a substrate for pullulan production by Aureobasidium pullulans." APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 55, no. 1, octobre 1995 (1995-10), pages 27-44, XP000915013 ISSN: 0273-2289 abrégé page 34 page 29</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	<p>1,8-10, 13,14,16</p>

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *G* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 février 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/02/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ROSEIRO J C ET AL: "BATCH AND FED-BATCH CULTIVATION OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS IN CAROB EXTRACTS"</p> <p>LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT & TECHNOLOGIE, vol. 25, no. 3, 1992, pages 289-293, XP000922972</p> <p>ISSN: 0023-6438</p> <p>le document en entier</p>	<p>1,8-10, 13,14,16</p>